



①⑨ BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENTAMT

⑫ Patentschrift
⑩ DE 43 05 405 C 1

⑤① Int. Cl.⁵:
G 01 N 33/48
C 12 Q 1/00
C 12 M 1/34
C 12 M 3/00
B 01 L 3/00

②① Aktenzeichen: P 43 05 405.6-52
②② Anmeldetag: 22. 2. 93
④③ Offenlegungstag: —
④⑤ Veröffentlichungstag
der Patenterteilung: 26. 5. 94

DE 43 05 405 C 1

Innerhalb von 3 Monaten nach Veröffentlichung der Erteilung kann Einspruch erhoben werden

⑦③ Patentinhaber:

H ring, Steffen, Dr.sc.med., Innsbruck, AT

⑦④ Vertreter:

von Bezold, D., Dr.rer.nat.; Schütz, P., Dipl.-Ing.;
Heusler, W., Dipl.-Ing., Pat.-Anwälte, 80333 München

⑦② Erfinder:

Antrag auf Nichtnennung

⑤⑥ Für die Beurteilung der Patentfähigkeit
in Betracht gezogene Druckschriften:

DE	33 21 239 C2
DE	40 20 917 A1
DE	39 32 685 A1
DE	39 23 279 A1
DE	37 36 027 A1
DE	37 18 066 A1
DE	33 17 551 A1
DD	2 18 959 A1
EP	05 19 110 A1
WO	82 03 227

⑤④ Vorrichtung zum Untersuchen eines Objekts, das sich in einer ein Substrat bedeckenden Perfluorflußigkeit befindet

⑤⑦ Vorrichtung zum Untersuchen eines Objekts, z. B. Zellen und dgl., das sich in einer ein Substrat (22) bedeckenden Perfluorflußigkeit befindet, mit einer geschlossenen Perfluorkammer (10), die an ihrer Unterseite eine bezüglich eines Substrats (22) abdichtbare Öffnung (16) aufweist und an ihrer Oberseite geschlossen oder verschließbar ist, und einen Einlaß und einen Auslaß für eine Perfluorflußigkeit sowie eine Öffnung (28) zum Einführen einer Untersuchungsvorrichtung aufweist, wobei der Einlaß durch die Öffnung (26) zum Einführen der Untersuchungsvorrichtung (28) gebildet ist und mit einem Perfluorflußigkeitswechsler (12), mittels dessen wahlweise verschiedene Flüssigkeiten in die zur Einführung der Untersuchungsvorrichtung (28) dienende Öffnung (26) einspeisbar sind (Fig. 1).

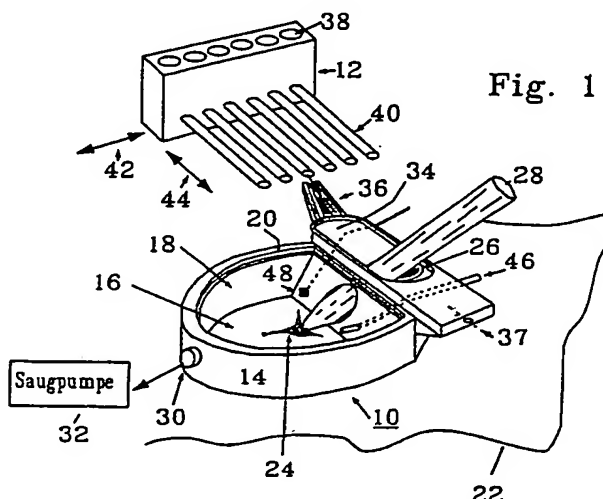


Fig. 1

DE 43 05 405 C 1

Es ist bekannt, Zellen, Zellenverbände, Gewebe, Gewebeschnitte, Slice-Präparate und andere Untersuchungsobjekte in einer Bad- oder Perfusionsflüssigkeit bezüglich ihrer elektrischen Eigenschaften oder metabolischen Eigenschaften zu untersuchen. Bei vielen Untersuchungsverfahren dieser Art ist ein schneller Wechsel der Perfusionsflüssigkeit (Testlösung) erforderlich.

Die Verfahren zur schnellen Applikation von Perfusionsflüssigkeiten bei diesen sog. Konzentrations-sprungverfahren können generell in zwei Gruppen unterteilt werden. Erstens sogenannte Superfusionsverfahren, bei denen man die Testlösungen mit Hilfe von beweglichen oder fixierten Mikrokapillaren über die Untersuchungsobjekte fließen läßt, und zweitens Verfahren, bei denen ein suspensiertes Untersuchungsobjekt, z. B. eine nichtadhärente Zelle, in ein Perfusionsröhrchen eingebracht und dann durch Perfusionsflüssigkeit, die man durch dieses Röhrchen strömen läßt, perfundiert wird. Bei einer solchen Einrichtung, die aus der EP 0 519 110 A1 bekannt ist, verläuft das als eine Art v n Perfusionskammer dienende Röhrchen von einem Sauganschluß aus schräg nach unten und ist dann zu einer Mündung hin hakenartig schräg nach oben gekrümmt. In die Mündung wird eine Meßvorrichtung, z. B. eine Pipette, eingeführt. Die verschiedenen Perfusionsflüssigkeiten können aus napfartigen Vertiefungen eines drehbaren und anhebbaren Tisches, in die die Mündung des Röhrchens eingetaucht wird, angesaugt werden.

Aus der DD 2 18 959 A1 und der DE 33 17 551 A1 sind geschlossene Perfusionskammern bekannt. Objekte, die sich in einer solchen Perfusionskammer befinden, sind von außen nicht zugänglich.

Aus der WO 82/03227 ist eine Vorrichtung zum Kultivieren von Zellen bekannt, die einen zylindrischen Körper aus Polycarbonat enthält, der an einem oder beiden Enden kegelstumpfförmig ausgebildet ist und eine flache Ausdrehung aufweist, in der ein Perfusionsflüssigkeits-Einlaßkanal sowie ein Perfusionsflüssigkeits-Auslaßkanal münden. Die Ausdrehung bildet zusammen mit einer auf das kegelstumpfförmige Ende aufgesetzten Zellkulturschale eine geschlossene Perfusionskammer. Die Abdichtung zwischen dem Körper und der Zellkulturschale erfolgt durch eine sich an dem kugelförmigen Teil des Körpers befindende O-Ring-Dichtung.

Aus der DE 39 23 279 A1 ist eine Vorrichtung zur Kultivierung von Zellen bekannt, die eine Trägerfolie enthält, welche zwischen zwei ineinandergreifende konzentrische Ringe trommelfellartig eingeklemmt ist und den Boden einer oben offenen, mit einem Zulauf und einem Ablauf versehenen Perfusionskammer bildet.

Die oben geschilderten Verfahren weisen prinzipielle Unzulänglichkeiten auf. So gestatten die Superfusionsverfahren keinen vollständigen (absoluten) Wechsel der das Untersuchungsobjekt umgebenden Badlösung, diese wird außerdem zwangsläufig durch die applizierten Substanzen kontaminiert. Mit dem zweiten genannten Verfahren können nur suspendierte Objekte untersucht werden, nicht jedoch Objekten wie Zellen und dergleichen, die an einem Substrat haften.

Der vorliegenden Erfindung liegt ausgehend von diesem Stand der Technik die Aufgabe zugrunde, eine Vorrichtung anzugeben, bei der ein schneller Wechsel der Perfusionsflüssigkeit ohne Kontaminationsprobleme und eine Untersuchung einer Auswahl von Objekten,

die an einem Substrat haften, einfach durchgeführt werden können.

Diese Aufgabe wird durch eine Vorrichtung mit den Merkmalen des Anspruchs 1 gelöst.

Weiterbildungen und vorteilhafte Ausgestaltungen der erfindungsgemäßen Vorrichtung sind Gegenstand von Unteransprüchen.

Die vorliegende Vorrichtung ermöglicht es, Objekte, wie Zellen und dergleichen, die an einem Substrat haften, zu perfundieren. Die Perfusionsflüssigkeit (Testlösung) kann rasch geändert werden. Eine Verunreinigung eines Bades, in dem sich das Untersuchungsobjekt vor und nach der Perfusion mit der Vorrichtung befinden soll, wird vermieden. Ein an einem Substrat haftendes Untersuchungsobjekt kann im Verlaufe der Untersuchungen vom Substrat abgelöst werden, ohne dabei die Perfusionskammer zu verlassen.

Im folgenden werden Ausführungsbeispiele der Erfindung unter Bezugnahme auf die Zeichnungen näher erläutert.

Es zeigt

Fig. 1 eine vereinfachte perspektivische Ansicht der wesentlichen Teile der Vorrichtung;

Fig. 2 eine Schnittansicht einer weiteren Ausführungsform einer Perfusionskammer und

Fig. 3 eine Schnittansicht einer weiteren Ausführungsform einer Perfusionskammer.

Die Vorrichtung, deren wesentliche Teile in Fig. 1 dargestellt sind, enthält eine Perfusionskammer 10 und einen Perfusionsflüssigkeitswechsler 12. Die Perfusionskammer 10 hat eine im wesentlichen ringförmige Seitenwand 14, die eine untere Öffnung 16 und eine obere Öffnung 18 der Perfusionskammer 10 begrenzt. Die obere Öffnung 18 bildet einen Sitz 20 für einen nicht dargestellten, dicht schließenden Deckel. Die untere Öffnung ist an der Unterseite der Perfusionskammer mit einer Dichtung, z. B. in Form eines in einer Nut sitzenden O-Ringes oder einer Elastomerschicht (nicht dargestellt) versehen, so daß die untere Öffnung abdichtend auf ein Substrat aufgesetzt werden kann, auf dem ein Untersuchungsobjekt 24 haftet. Die Seitenwand 14 ist ferner mit einem von außen oben nach innen unten schräg durchgehenden Kanal oder Loch 26 versehen, durch das eine Untersuchungsvorrichtung, z. B., wie dargestellt, eine Mikropipette 28 für Patch-Clamp-Untersuchungen oder irgendeine andere Elektrode oder Vorrichtung eingeführt werden kann. Gegenüber der Mündung des Loches 26 weist die Seitenwand 14 einen Auslaß 30 in Form einer Rohrstutzens auf, der über eine nur schematisch dargestellte Schlauchleitung mit einer Saugpumpe 32 verbunden ist. Da sich der Einlaß oberhalb des Auslasses befindet, kann die Perfusion auch ohne Saugpumpe nur durch die Wirkung der Schwerkraft erfolgen, sie kann kontinuierlich oder intermittierend durchgeführt werden.

Am oberen Ende mündet das Loch 26 in einer Wanne 34, die an einem Ende mit einer Einlaufrinne 36 versehen ist. Ein Gewindeloch 37 dient zur Befestigung der Perfusionskammer an einer Halterung, wie einem Manipulator.

Der Perfusionsflüssigkeitswechsler enthält mehrere, bei dem dargestellten Beispiel sechs nur schematisch dargestellte Vorratsbehälter 38 für Perfusionsflüssigkeiten und gewünschtenfalls Spül- und Badflüssigkeiten. Die Vorratsbehälter sind jeweils mit einem Auslaufrohr 40 und einer nicht dargestellten Abgabevorrichtung, z. B. einer Art von Pumpe, versehen, mit der eine bestimmte Menge der jeweiligen Flüssigkeit aus dem zu-

gehörigen Auslaufrohr 40 zum Austreten gebracht werden kann. Die Anordnung mit den Auslaufrohren 40 ist auf einer nicht dargestellten Verstellvorrichtung angeordnet, die eine Verstellung in Querrichtung 42 und in Längsrichtung 44 der Auslaufrohre 40 ermöglicht, so daß jedes gewünschte Auslaufrohr auf die Einlaufrinne 36 der Perfusionskammer in Deckung eingestellt werden kann. Alternativ kann z. B. auch ein Perfusionsflüssigkeitswechsler verwendet werden, bei dem die Auslaufrohre radial an einer drehbaren Scheibe angeordnet sind.

In die Perfusionskammer 10 kann außerdem mindestens ein Faserlichtleiter 46 (Monofaser oder Faserbündel) flüssigkeits- und gasdicht eingeführt sein, der eine Beleuchtung des Untersuchungsobjekts 24 und/oder die Auskopplung von Strahlung (z. B. Fluoreszenzstrahlung) vom Untersuchungsobjekt ermöglicht. Statt dessen oder zusätzlich können in der Perfusionskammer auch ein Photodetektor, wie eine Photodiode, und/oder eine Lichtquelle, wie eine LED, vorgesehen sein. Schließlich kann die Perfusionskammer eine Referenzelektrode 48 für elektrophysiologische Messungen enthalten.

Zum Untersuchen eines Objektes 24, z. B. einer Zelle, die auf einem Substrat 22, z. B. einem Deckgläschen haftet, das sich in einer mit einer Badflüssigkeit gefüllten Petrischale befindet, wird die Perfusionskammer wie dargestellt, so auf das Substrat aufgesetzt, daß die Zelle in das von der Seitenwand 14 umschlossene Kammervolumen zu liegen kommt. Da die untere Öffnung 16 der Perfusionskammer durch das Substrat und die obere Öffnung 18 durch den nicht dargestellten Deckel verschlossen sind, sind das zum Einführen der Untersuchungsvorrichtung 28 dienende Loch 26 und der Auslaß 30 die einzigen Öffnungen, die vom Kammervolumen nach außen führen.

Dies stellt ein wesentliches Merkmal der vorliegenden Perfusionskammer dar. Das Loch 26 dient gleichzeitig als Einlaß für die Perfusionsflüssigkeiten, die vom Perfusionsflüssigkeitswechsler 12 in die Wanne 34 eingeleitet werden. Zum Wechsel der Perfusionsflüssigkeit wird die Saugpumpe 32 in Betrieb gesetzt und die im Kammervolumen enthaltene Flüssigkeit durch den Auslaß 30 abgesaugt. Gleichzeitig wird neue Perfusionsflüssigkeit in das Loch 26 eingespeist. Da die Perfusionskammer 10 bis auf den Einlaß 26 und den Auslaß 30 geschlossen ist, geht der Wechsel schnell und gründlich vonstatten, außerdem sind keine weiteren Öffnungen vorhanden, durch die Luft angesaugt werden kann, was die Untersuchungen unter Umständen nachteilig beeinträchtigt.

In Fig. 2 ist ein anderes Ausführungsbeispiel einer Perfusionskammer für die vorliegende Einrichtung dargestellt. Entsprechende Elemente wie in Fig. 1 sind mit den gleichen Bezugszeichen mit angefügtem "a" bezeichnet, so daß eine kurze Erläuterung ausreichen dürfte.

Die Perfusionskammer 10a gemäß Fig. 2 enthält einen Körper 50 aus Acrylglas, der unten einen ringförmigen, näherungsweise zylindrischen Teil 14a aufweist, der der Seitenwand 14 in Fig. 1 entspricht. Die obere Öffnung des ringförmigen Teiles 14a ist durch einen Deckel 15 dicht geschlossen. Die untere Öffnung ist von einer Nut umgeben, in der sich ein O-Ring 52 befindet. An den ringförmigen Teil 14a schließt sich ein schräg nach oben verlaufendes Seitenteil an, das ein Loch 26a für die Untersuchungsvorrichtung 28a und ein Loch für den Faserlichtleiter 46a enthält. Das obere Ende des Loches 26a

ist von einer wannenartigen Vertiefung 34a umgeben, die der Wanne 34 in Fig. 1 entspricht. Das Substrat 22a ist ein Deckgläschen, das sich in einer Petrischale 53 befindet, die eine Badflüssigkeit 54 enthält. Die Perfusionskammer (und ggf. auch der Deckel) ist mit einer elektrisch leitenden Schicht 49 versehen, die geerdet ist und als elektrische Abschirmung dient. Sie kann ihrerseits mit einer Isolierschicht 51 überzogen sein. Die Petrischale 53 steht auf einem transparenten Tisch 56 eines inversen Mikroskops, von dem nur ein Teil eines Objektiivs 58 dargestellt ist. Solche Untersuchungssysteme sind bekannt.

Fig. 3 zeigt einen Horizontalschnitt einer Abwandlung der Perfusionskammer 10a gemäß Fig. 2. Entsprechende Teile sind mit den gleichen Bezugszahlen wie in Fig. 1 und 2 bezeichnet, denen der Buchstabe "b" angefügt ist. Das Kammervolumen wird hier in seitlicher Richtung durch ein poröses, im Querschnitt etwa C-förmiges Bauteil 60 begrenzt, das von der ringförmigen Seitenwand 14b mit Abstand umgeben wird, so daß ein Zwischenraum 62 verbleibt, in dem der Auslaß 30b mündet. Die Perfusionsflüssigkeit im Kammervolumen 11 wird also hier durch das poröse Bauteil 60 hindurch in den Zwischenraum 62 und dann durch den Auslaß 30 abgesaugt. Der ringförmige Zwischenraum 62 ist unten und oben geschlossen. Das poröse Bauteil 60 kann aus einem porösen Sinterkörper aus Keramik oder Kunststoff, wie PTFE oder auch aus Metall bestehen, wobei er dann als Abschirmung oder Referenzelektrode dienen kann. Der Körper 50b der Perfusionskammer 10b gemäß Fig. 3 kann aus einem beliebigen leitenden oder nichtleitenden Material, z. B. Kunststoff, Glas, oder auch aus Metall bestehen.

Die Perfusionskammer 10b gemäß Fig. 3 entspricht im übrigen der gemäß Fig. 2, so daß sich eine weitere Erläuterung erübrigt.

Die beschriebenen Ausführungsbeispiele lassen sich in der verschiedensten Weise ausgestalten und abwandeln. In der Kammerwand oder diese umgebend kann eine Thermostatisierungsvorrichtung zum Heizen und/oder Kühlen des Kammervolumens vorgesehen sein, z. B. Peltier-Elemente oder Kanäle für ein Heiz- oder Kühlfluid. Die einlaßseitige Mündung der Öffnung (Kanal) 26 oder 26a kann trichterartig, rinnenförmig oder in irgend einer anderen geeigneten Weise ausgebildet sein. Die Perfusionskammer und/oder ihr Deckel können aus durchsichtigem oder undurchsichtigem Material bestehen. Die Perfusionskammer kann einstückig, d. h. bis auf Einlaß-, Auslaß- und abdichtbare Öffnung geschlossen sein. Die durch ein anliegendes Substrat abdichtbare Öffnung muß sich nicht unbedingt unten befinden, sie kann auch in der Seitenwand vorgesehen sein.

Patentansprüche

1. Vorrichtung zum Untersuchen eines Objekts (24), das sich in einer ein Substrat (22) bedeckenden Perfusionsflüssigkeit befindet, mit einer Perfusionskammer (10), die einen Perfusionsflüssigkeits-Einlaß (26), in den eine Untersuchungsvorrichtung (28) einführbar ist, einen Perfusionsflüssigkeits-Auslaß (30) und eine Öffnung (16) aufweist, die an einer Seite der Perfusionskammer (10) angeordnet und mit einer Dichtung (52) versehen ist, so daß die Öffnung (16) abdichtend auf das Substrat (22) aufsetzbar ist.

2. Vorrichtung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß sich die abdichtbare Öffnung (16) an

- der Unterseite der Perfusionskammer (10) befindet.
3. Vorrichtung nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß die Perfusionskammer (10) eine durch einen Deckel (15) verschließbare Öffnung (18) aufweist.
4. Vorrichtung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß der Perfusionsflüssigkeits-Einlaß (26) aus einem Kanal besteht, der von der Innenseite der Perfusionskammer (10) schräg nach oben verläuft und an seinem oberen Ende von einer Wanne (34) zur Aufnahme von Perfusionsflüssigkeit umgeben ist.
5. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 4, gekennzeichnet durch einen Perfusionsflüssigkeitswechsler (12), mittels dessen wahlweise verschiedene Flüssigkeiten in den zur Einführung der Untersuchungsvorrichtung (28) dienenden Perfusionsflüssigkeits-Einlaß (26) einspeisbar sind.
6. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß der Perfusionsflüssigkeits-Auslaß (30) mit einer Saugpumpe (32) verbunden ist.
7. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 6, gekennzeichnet durch einen Lichtleiter (46), der abgedichtet durch die Wand (14) der Perfusionskammer (10) hindurchgeführt ist.
8. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 7, gekennzeichnet durch einen in der Perfusionskammer (10) angeordneten Lichtsensor.
9. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 8, gekennzeichnet durch eine in der Perfusionskammer (10) angeordnete Referenzelektrode (48).
10. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 9, dadurch gekennzeichnet, daß die Perfusionskammer (10) eine ringförmige Wand (14) aufweist, die unten die abdichtbare Öffnung (16) und oben eine durch einen Deckel (15) verschließbare Öffnung (18) bildet.
11. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 10, dadurch gekennzeichnet, daß die Untersuchungsvorrichtung (28) eine Mikropipette aufweist.
12. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 11, dadurch gekennzeichnet, daß die Perfusionskammer (10) mit einer elektrischen Abschirmung (49) versehen ist.
13. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 12, dadurch gekennzeichnet, daß die Perfusionskammer (10) mit einer Thermostatisiereinrichtung und einem Temperatursensor versehen ist.

Hierzu 3 Seite(n) Zeichnungen

50

55

60

65

- Leerseite -

Fig. 1

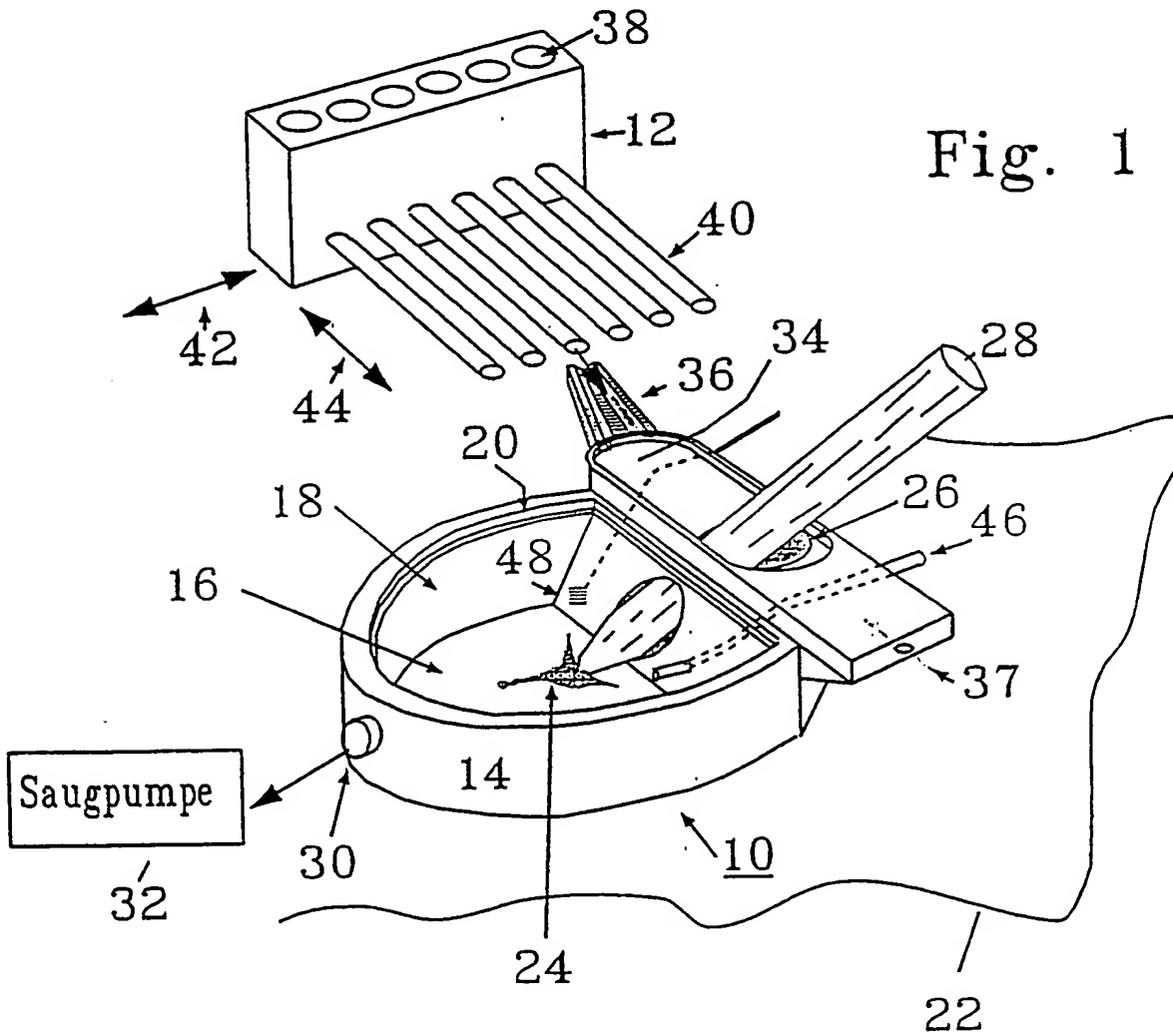


Fig. 2

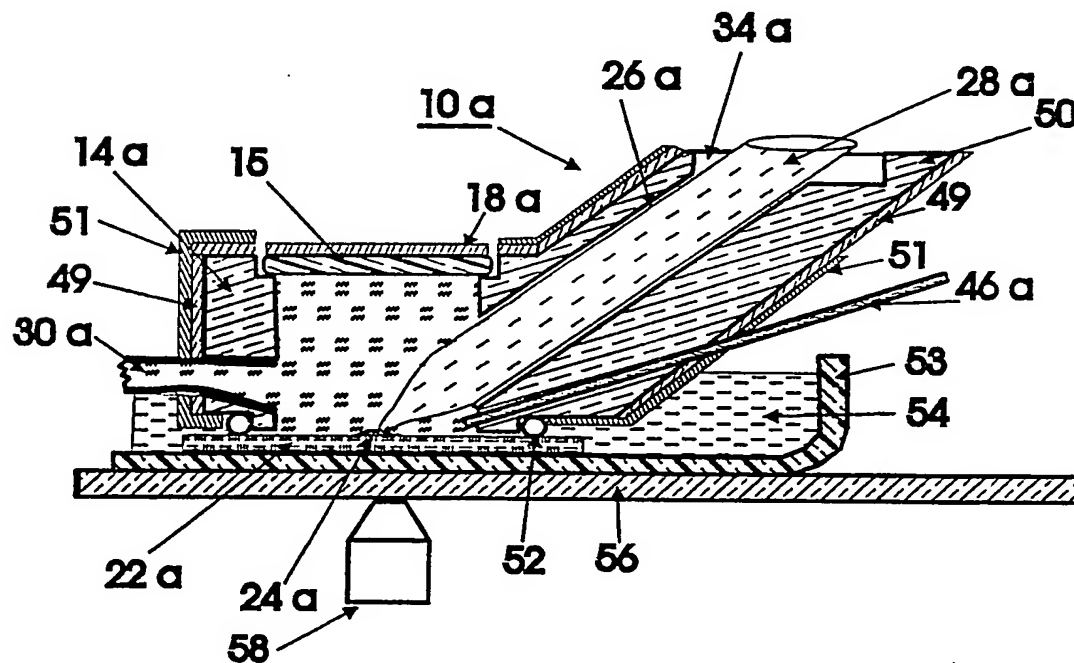


Fig. 3

